

OKOLIŠ

In vivo i in vitro promjene uzrokovane antropogenim učincima

Josip Barišić i Roberta Sauerborn Klobučar

Laboratorij za ihtopatologiju – biološke materijale
Zavod za kemiju materijala



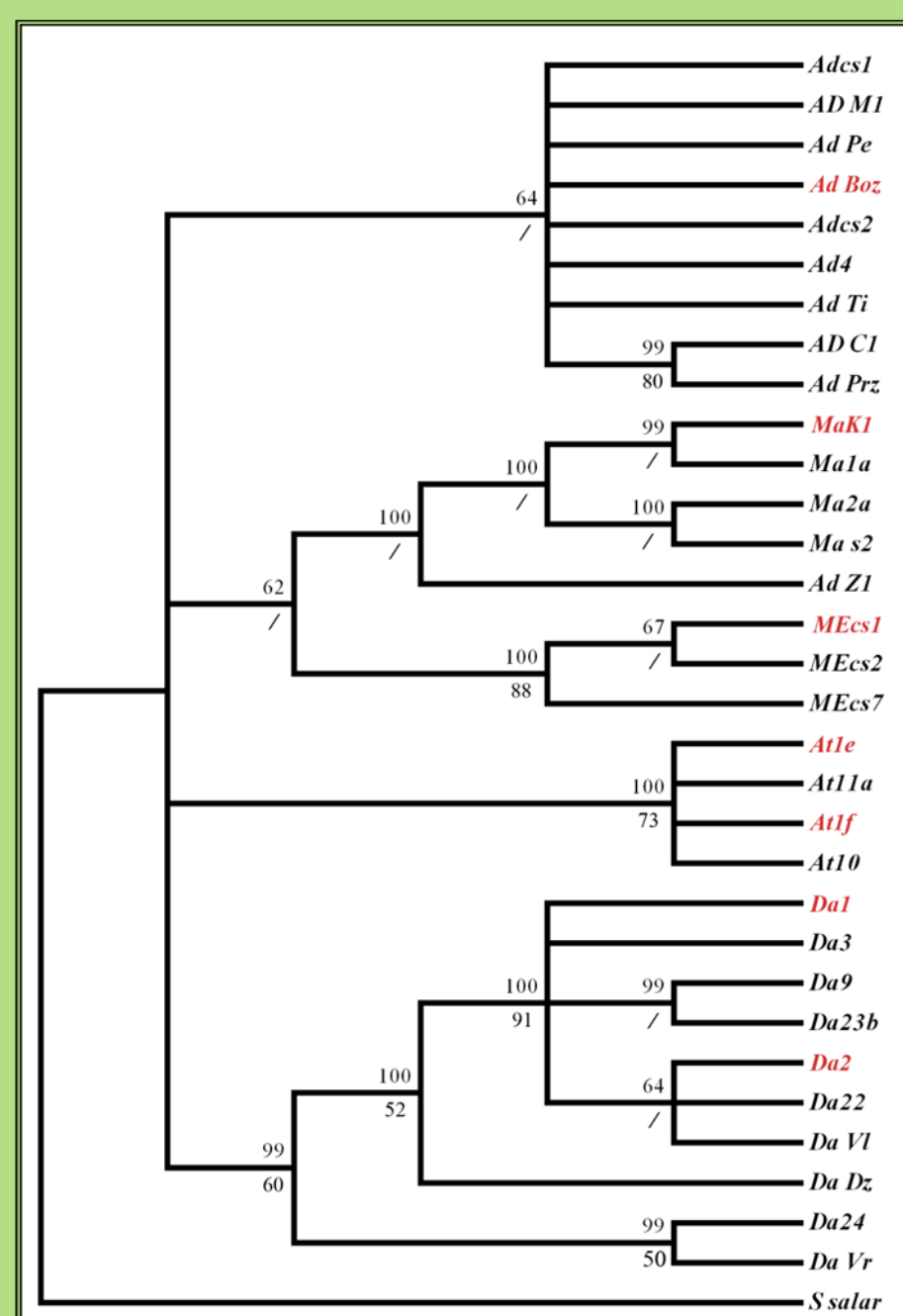
ŠKOLJKAŠI

RAKOVI

RIBE



Filogenetska raznolikost riba



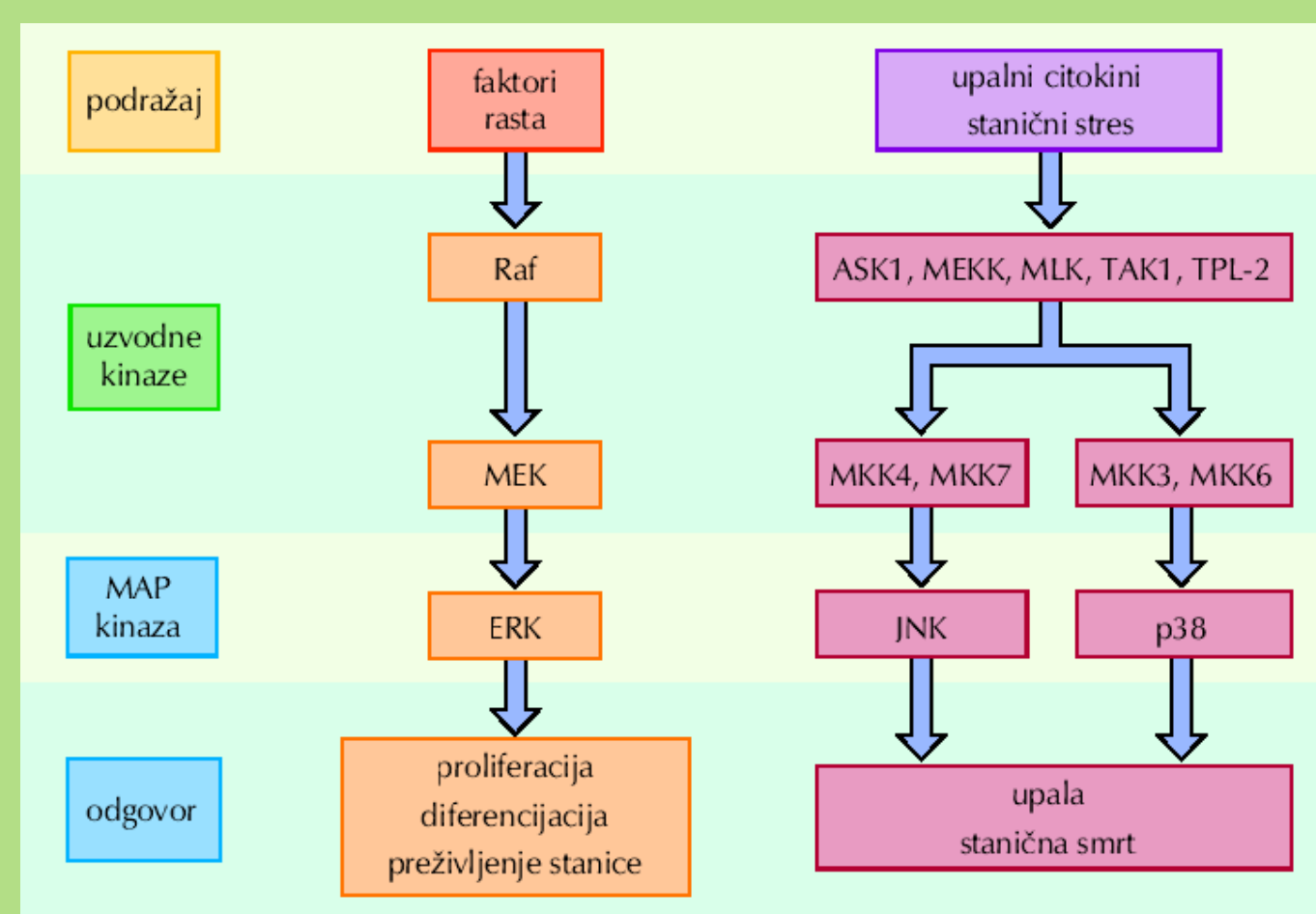
Filogenetsko stablo haplotipova potočne pastvrve (*Salmo trutta* L.) krških rijeka Hrvatske napravljeno metodom *Maximum Parsimony*

U akvakulturnoj proizvodnji organizmi su zbog specifičnih uvjeta izloženi pojačanom stresu, raznim uzročnicima bolesti, narušenim uvjetima okoliša što izaziva kontinuirane i ozbiljne ekonomske gubitke. Kako bi se ti gubici smanjili, a prinosi povećali sve se više koristi komercijalna hrana obogaćena dodatcima kao što su promotori rasta i antibiotici, u vodu se dodaju pesticidi, čime tako dobiveni proizvodi/(ribe, rakovi, školjkaši) bivaju upitne kvalitete. Ovi aditivi se akumuliraju u uzgajanim i ostalim slobodno živućim vrstama koje dijele isti životni prostor, onečišćuju okoliš, te indirektno ugrožavaju zdravlje ljudi (antimikrobna rezistencija, genotoksičnost). U prevenciji i kontroli bolesti kontinuirano se provodi biološki nadzor (biomonitoring) uzgajanih vrsta praćenjem i izradom biokemijskih/histoloških profila, bakteriološkom pretragom, te praćenjem molekularnih biomarkera u *in vivo* i *in vitro* sustavu. Histopatološke promjene su snažan pokazatelj izloženosti prirodnim ili antropogenim stresorima i rezultat su negativnih biokemijskih i fizioloških promjena u organizmu. Bakteriološka pretraga uzgajanih organizama jedna je od najvažnijih metoda za njihovu uspješnu kulturu jer ukazuje na pojavu uzročnika bolesti. Kako sve mjerljive promjene imaju početak na molekularnoj razini, biološki se nadzor pouzdano može pratiti praćenjem promjena određenih molekularnih mehanizama. Od molekularnih promjena pratila se indukcija signalnih molekula tzv. MAP kinaza (p38, pERK) nakon utjecaja različitih stresora iz okoliša (pesticida, antibiotika) na modelu ribljih staničnih kultura putem imunofluorescentnih tehnika. Ekotoksikološki gledano ovaj rani događaj može poslužiti kao biomarker izloženosti jer se pokazalo da mu je aktivacija proporcionalna zagađenju (koncentraciji ksenobiotika). Procjena genotoksičnog učinka antibiotika nitrofurantoina pratila se mjerenjem apoptoze na protočnom citometru, te Comet testom na Pac2 stanicama zebrice.

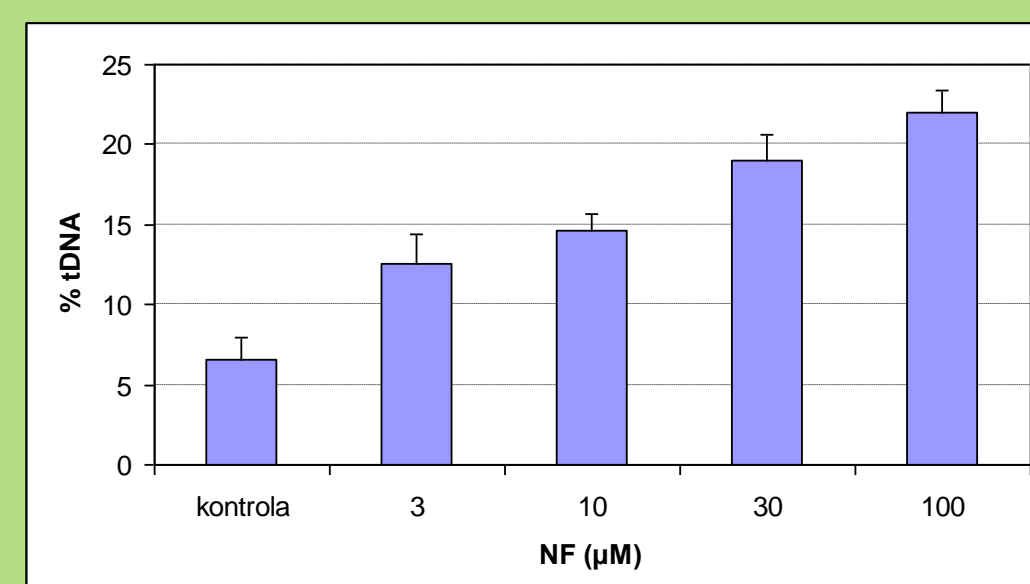
Akvakultura zauzima sve značajniji položaj u suvremenom gospodarstvu. Intenziviranjem proizvodnje pojavljuju se zdravstveni problemi unutar samih uzgojnih populacija, a u nekim je slučajevima ugroženo i zdravlje krajnjeg potrošača. Cilj istraživačkog rada biti će istraživanje i precizna definicija različitih metaboličkih potencijala unutar pojedinih vrsta tkiva putem histokemijskih postupaka. Obzirom da u dosadašnjim studijama neke kemijske supstance (posebice enzimi) u tkivima vodenih organizama nisu potpuno istražene, ovom tehnikom proširile bi se spoznaje o biokemijskim reakcijama istraživanih tkiva, ali isto tako bi se primjenom imunohistokemijskih i molekularnih metoda u istraživanjima proširila znanja o imunološkim reakcijama i interakcijama na molekularnoj razini s naglaskom na regulacijskim mehanizmima za održavanje konstantnosti unutarnje ravnoteže u odnosu na negativne utjecaje čovjeka i okoliša.

Molekularni biomarkeri / biotestovi u praćenju ekološkog rizika

AKTIVACIJA SIGNALNIH PUTEVA PUTEM MAP KINAZA U RIBLJIM STANIČIM KULTURAMA

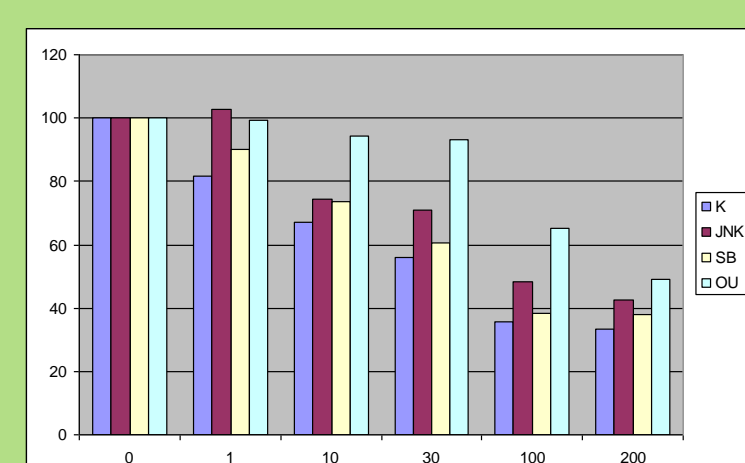


Detekcija DNA oštećenja nakon 24 h



Comet assay - rezultat 24 h–tnog izlaganja Pac2 stanica antibiotikom nitrofurantoinom

Tretman stanica s inhibitorima MAPK uz različite koncentracije NF

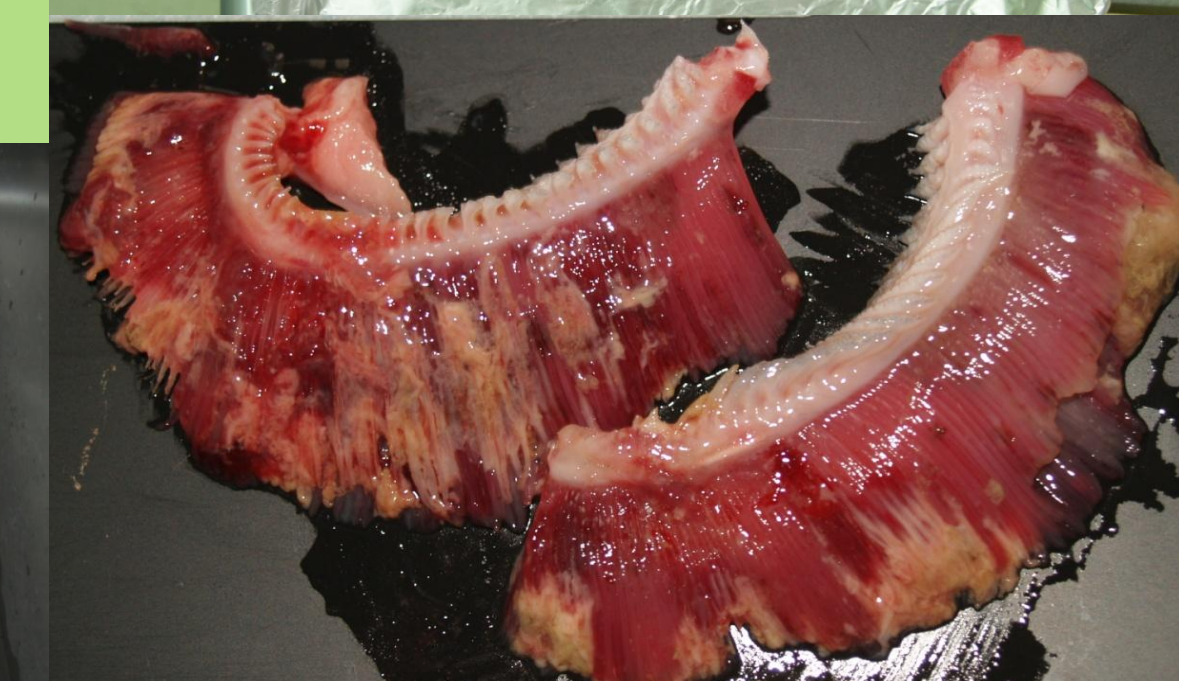


Proteini izolirani iz tretiranih stanica provjerni su metodom Western blot na omjer fosforiliranih i ukupnih MAPK

Preživljavanje stanica nakon tretmana s MAPK inhibitorima.

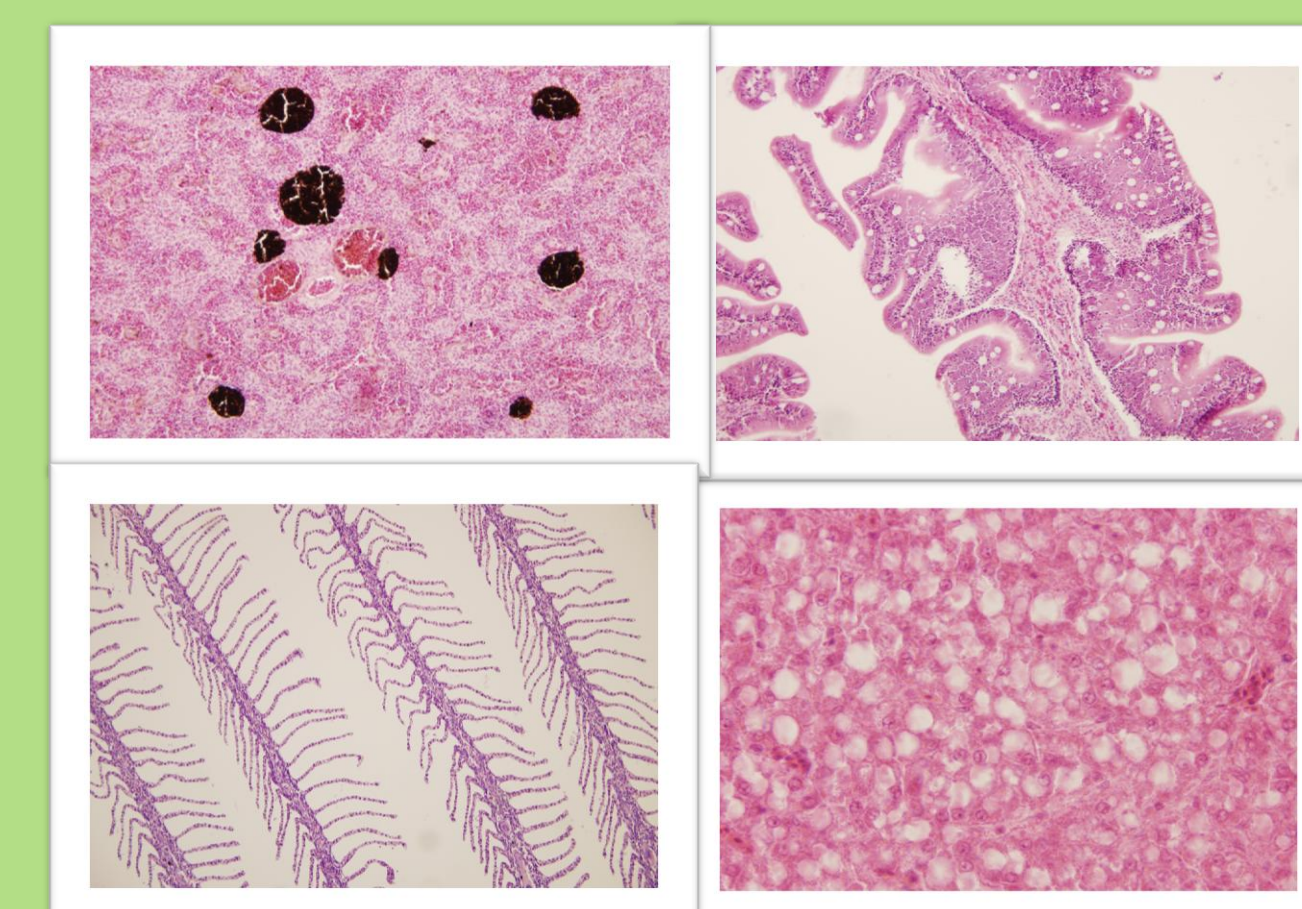
Bakteriološka pretraga

Bolesti riba uzrokovane bakterijama smatraju se glavnim problemom u razvijenoj akvakulturi i uzrokuju masovna uginuća, smanjenu proizvodnju i kvalitetu uzgajanih organizama. Većina infekcija počinje na koži i sluznicama. U nekim bolestima uzročnik ostane lokaliziran na površini sluznice i uzrokuje oštećenja oslobađajući toksine. U većini slučajeva, infekciju uzrokuju patogeni koji prodiru kroz epitel kože, te se šire u dublje slojeve kože i mišića, a sam tijekom bolesti tada ovisi o otpornosti organizma, te patogenosti samog uzročnika. Bakteriološka pretraga provodi se korištenjem biokemijskih testova te brzim aglutinacijskim testovima uz obaveznu izradu antibiograma. Istraživanja su pokazala da izolirane bakterije pripadaju uglavnom rodovima *Aeromonas*, *Pseudomonas* i *Vibrio*.

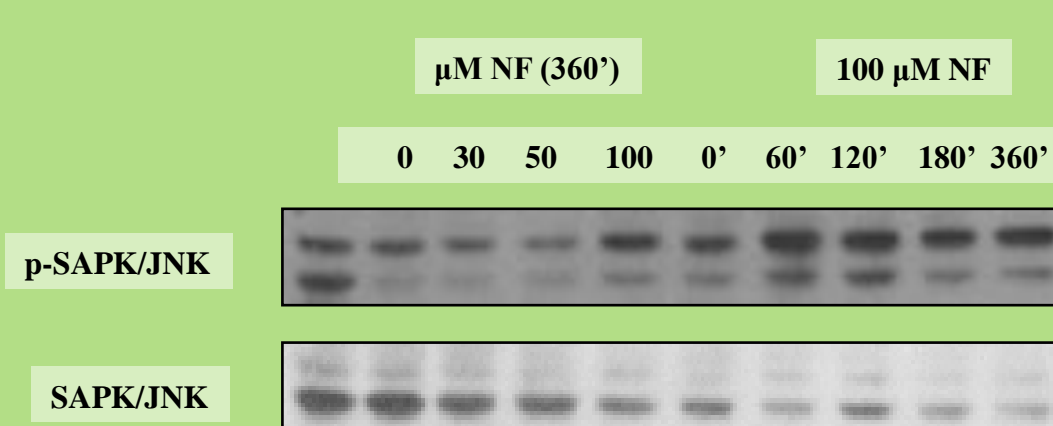


Izrada biokemijskih/histoloških profila

Kronična izloženost riba kemijskim zagađivačima uzrokuje niz promjena u različitim organima poput škrge, bubrega, jetre i slezene. Uz prikladne patohistološke tehnike kao brze metode za otkrivanje negativnog učinka različitih agensa, moguće je odrediti stupanj zagađenja.



Pac2 stanice – 24-satni embrioblasti iz ribe zebrice *Danio rerio*



ZAHVALA: Svi rezultati dobiveni su u sklopu projekta MZOŠ broj 098-1782739-2749 Substancična biokemijska i filogenetska raznolikost tkiva riba, rakova i školjaka pod voditeljstvom dr.sc. Rozelinde Čož-Rakovac